

Análise da região carbox-terminal da glicoproteína C (gC) e sua utilização na diferenciação entre Herpesvírus Bovino Tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5)*

PAULO AUGUSTO ESTEVES

Paulo Michel Roehe (Orientador - UFRGS)

Ana Cláudia Franco (Co-Orientadora - UFRGS)

Banca: Amauri Braga Simonetti (UFRGS), Cláudio Wageck Canal (UFRGS), Odir Antônio Dellagostin (UFPEL)

Membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) tem sido associados a diferentes condições clínicas em bovinos. Assim, diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 é uma valiosa informação objetivando um melhor entendimento da patogenia e epidemiologia destes vírus no rebanho bovino. Contudo, métodos para diferenciação são escassos devido às reações cruzadas originadas da alta homologia genômica e antigênica entre estes vírus. O presente estudo concentrou-se na análise da região carboxi-terminal da glicoproteína C (nucleotídeos 16763 - 17337 em BoVH-1 e 17671 - 18242 em BoHV-5), uma vez que tal região apresentou características potenciais que permitissem a diferenciação entre estes vírus. Assim, no primeiro capítulo do presente trabalho a região carboxi-terminal da gC foi utilizada como alvo para o desenvolvimento de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida da Análise da Restrição Enzimática (REA) do fragmento amplificado, capaz de detectar isolados de BoHV-1 ou BoHV-5, gerando fragmentos com tamanhos de 575 pares de base (pb) frente a BoHV-1 e 572 pb frente a BoHV-5. A diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 foi obtida após a digestão dos amplicons com a enzima de restrição *Bgl* I. No segundo capítulo, a região carboxi-terminal de 23 amostras Sul-Americanas de BoHV-1 ou BoHV-5 foram amplificadas e sequenciadas. A análise filogenética realizada com as sequências de nucleotídeos revelou identidade variando entre 98,7 a 99,8% (BoHV-1/ BoHV-1), 88,3 a 92% (BoHV-1/ BoHV-5) e 96 a 99,7% (BoHV-5/ BoHV-5). Alinhamentos realizados com sequências de aminoácidos revelaram identidade variando entre 97,5 a 99,5% (BoHV-1/ BoHV-1), 77,5 a 84,4% (BoHV-1/ BoHV-5) e 92,1 a 99,5% (BoHV-5/ BoHV-5). Análises filogenéticas revelaram, ainda, que: i) alguns isolados de BoHV-5 apresentaram um padrão diferente daqueles até o presente reconhecidos; ii) uma amostra isolada no Uruguai (BoHV-1.2) apresentou um padrão de agrupamento distinto quando comparado com as outras amostras de BoHV-1.2. O terceiro capítulo apresenta o primeiro relato de detecção de BoHV-5 de sêmen bovino através da análise antigênica, amplificação diferencial da região amino-terminal do gene da gC de BoHV-1 e 5, seguida da caracterização por REA do isolado em estudo. Em síntese, através da utilização da gC foi possível avaliar a homologia entre as amostras Sul-Americanas estudadas; desenvolver uma PCR/REA diferencial entre estes vírus e relatar a detecção de uma amostra de BoHV-5 isolada à partir de sêmen contaminado.

Descritores: BoHV-1, BoHV-5, filogenia, PCR, sêmen.

Apresentada: 17 janeiro 2007

*Tese de Doutorado n. 75 (Especialidade: Virologia).134f. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias [www.ufrgs.br/ppgcv], Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS/Brasil. CORRESPONDÊNCIA: P.A. Esteves [paeesteves@yahoo.com.br].

Analysis and utilization of glycoprotein C (gC) carboxi-terminal region in the differentiation of Bovine Herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5)**

PAULO AUGUSTO ESTEVES

Paulo Michel Roehe (Adviser - UFRGS)

Ana Cláudia Franco (Co-Adviser – UFRGS)

Committee: Amauri Braga Simonetti (UFRGS), Cláudio Wageck Canal (UFRGS), Odir Antônio Dellagostin (UFPEL)

Members of the Herpesviridae family, Alphaherpesvirinae subfamily bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) have been associated to different clinical conditions of cattle. Thus, differentiation has become an important tool for a better understanding of the pathogenesis and epidemiology of BoHV infections in cattle. However, currently available methods for such differentiation are hampered by cross-reactions from high genomic and antigenic homology between these viruses. The present work focused on the analysis of the carboxy-terminal portion of glycoprotein C (gC), corresponding to nucleotides 16763 - 17337 on BoHV-1 and 17671 - 18242 on BoHV-5 once such region showed characteristics that would allow a clear distinction between BoHV-1 and 5. In view of that, in the first chapter, the carboxy-terminal region of gC was the target for the development of a Polymerase Chain Reaction followed by a Restriction Enzyme Analysis (PCR/REA) for differentiation between BoHV-1 and 5. The PCR/REA was designed to amplify a segment on the carboxy-terminal portion of the glycoprotein C (gC) gene, giving rise to amplicons of 575 base pairs (bp) for BoHV- 1, and 572 bp for BoHV-5. The amplicons were digested with the *Bgl* I restriction enzyme for differentiation between BoHV-1 and 5. In the second chapter the region previously described of 23 South American isolates of BoHV-1 and BoHV-5 were amplified and sequenced. In that region, nucleotide sequence alignments revealed identity ranged from 98,6 to 100% (BoHV-1/ BoHV-1), 89,5 to 92,7% (BoHV-1/ BoHV-5) and 95,9 to 100% (BoHV-5/ BoHV-5). The identity deduced from amino acid sequences ranged from 99,1 to 100% (BoHV-1/ BoHV-1), 86,5 to 92% (BoHV-1/ BoHV-5) and 95,2 to 100% (BoHV-5/ BoHV-5) . Phylogenetic analyses and deduced amino acid sequences revealed that: i) some BoHV-5 isolates seem to be “non a non b” subtype and ii) there is a Uruguayan BoHV-1.2 strain that has a distinct nucleotide and amino acid sequence when compared to others BoHV-1.2 strains. The third chapter of the present work contains the first report of a BoHV-5 strain isolated from the bovine semen by antigenic characterization, differential amplification of the N-terminal region of gC gene from BoHV-1 and 5 followed by genomic characterization by REA and antigenic characterization of the isolate analyzed.

Key words: BoHV-1, BoHV-5, phylogeny, PCR, semen.

Presented: 17 January 2007

**Doctoral Dissertation # 75 (Field: Virology). 90p. Graduate Program in Veterinary Sciences [www.ufrgs.br/ppgcv], Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS/Brazil. CORRESPONDENCE: P.A. Esteves [paeesteves@yahoo.com.br].